

**SILVIO JOSÉ VASCONCELOS**

**Efeito da injeção do biopolímero da cana-de-açúcar na  
prega vocal de coelhos: estudo comparativo com a  
hidroxiapatita de cálcio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji

SÃO PAULO

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vasconcelos, Silvio José de  
Efeito da injeção de biopolímero da cana-de-açúcar na prega vocal de coelhos :  
estudo comparativo com a hidroxiapatita de cálcio / Silvio José de Vasconcelos. -- São  
Paulo, 2014.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Otorrinolaringologia.  
Orientador: Domingos Hiroshi Tsuji.

Descritores: 1.Prega vocal 2.Disfonia 3.Laringoplastia 4.Biopolímeros  
5.Hidroxiapatita de cálcio 6.Coelhos

USP/FM/DBD-348/14

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes.  
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu,  
enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe.”

*Leonardo da Vinci*

*Dedico ...*

*À Deus, por tudo.*

*Aos meus pais, por uma vida inteira de sacrifício e renúncia em favor da minha educação moral e intelectual. Por terem me dado os dois mais valiosos bens que os pais podem deixar para um filho: o exemplo de vida e o conhecimento.*

*À minha esposa, pela ajuda, compreensão e eterno apoio. Perdoe minhas ausências, meu cansaço e minhas faltas. Obrigado por, junto com a nossa filha, fazerem tudo valer mais a pena.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**, por ter dado a oportunidade de me tornar aluno do programa de Pós-Graduação dessa instituição. Foi uma honra eu tê-lo como professor. Cada orientação, cada ensinamento e cada conselho foram muito preciosos para mim. Você será sempre alguém em quem vou me espelhar.

Ao **Dr. Silvio da Silva Caldas Neto** e ao **Dr. Nelson Costa Rego Caldas** (*in memoriam*) por terem me acolhido como pupilo e por terem ajudado, desde o início, na minha formação como otorrinolaringologista. Espero sempre honrá-los com minha prática e meu caráter.

Ao **Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes**, por toda a ajuda, disponibilidade e simpatia com a qual sempre me tratou. Posso dizer que suas atitudes, sua competência e sua simplicidade são exemplos a serem seguidos.

Ao **Dr. Rodrigo Augusto Souza Leão**, pela inestimável ajuda na realização desse trabalho e pelo companheirismo de longa data.

À **Prof. Dra. Mariana Lira**, por toda a consultoria e análise dos resultados histológicos.

Ao **Prof. Dr. José Lamartine Aguiar** pelo fornecimento do biopolímero em sua formulação gel e pelo apoio à realização desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rui Imamura** e ao **Prof. Dr. Ronaldo Frizzarini** pela valiosa contribuição durante meu exame de qualificação.

Ao **Sr. Sidcley Bernardino-Araújo** pela confecção das lâminas.

Aos funcionários da disciplina de Otorrinolaringologia **Marilede, Luci e Adilson**, pela ajuda, simpatia e disponibilidade com a qual sempre me trataram.

Aos **funcionários do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE** pela ajuda na etapa experimental desse trabalho.

Ao **Sr. Antônio Mendes Bezerra** (*in memoriam*) e toda a sua família, pela incondicional amizade e por todo apoio dado ao longo de muitos anos.

# SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

*Abstract*

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	04
2.1 Objetivo primário .....	05
2.2 Objetivos secundários .....	05
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	06
3.1 Fisiologia laríngea e Insuficiência glótica .....	07
3.2 Tratamento da insuficiência glótica .....	08
3.3 Materiais usados na IL .....	11
3.4 Hidroxiapatita de cálcio nas IL .....	12
3.5 Biopolímero de cana-de-açúcar .....	14
3.6 Resultados obtidos com as IL e com as tireoplastias .....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	19
4.1 Local do estudo .....	20
4.2 Tipo do estudo .....	20
4.3 Seleção e confinamento dos animais .....	20
4.4 Técnica cirúrgica .....	21
4.5 Preparação para o estudo histológico .....	23
4.6 Confeção das lâminas para o estudo histológico .....	25
4.7 Estudo histológico .....	26
4.8 Metodologia estatística .....	28

<b>5 RESULTADOS</b> .....	30
5.1 Presença de HCA ou BPCA nas pregas vocais dos coelhos .....	31
5.2 Achados histológicos e Comparação entre os grupos .....	32
5.2.1 Infiltrado inflamatório .....	32
5.2.2 Presença de fibrose e de angiogênese .....	35
5.2.3 Alterações na mucosa vocal .....	37
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	42
6.1 Delineamento do estudo e metodologia .....	43
6.2 Presença do material injetado nas pregas vocais dos coelhos .....	48
6.3 Estudo histológico dos materiais .....	49
6.3.1 Predominância celular .....	49
6.3.2 Presença de fibrose e neoformação vascular .....	51
6.3.3 Alterações na mucosa .....	53
6.4 Evolução dos parâmetros histológicos .....	54
6.5 Perspectivas .....	55
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59

## **APÊNDICES**

Apêndice 1 – Carta da Comissão de Ética da UFPE

Apêndice 2 – Carta da Comissão de Ética da FMUSP

## **LISTA DE SIGLAS**

EUA	Estados Unidos da América
FM	Faculdade de Medicina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	Universidade de São Paulo

## LISTA DE ABREVIATURAS

BPCA	Biopolímero de cana-de-açúcar
CG	Células gigantes
HCa	Hidroxiapatita de cálcio
IL	Injeção laringoplástica
LMN	Linfomononuclear
PMN	Polimorfonuclear
®	<i>Registered</i>
SCB	<i>Sugarcane biopolymer</i>
TM	<i>Trade Mark</i>
VHI	<i>Voice Handicap Index</i>

## LISTA DE SIMBOLOS

g	grama
kg	quilograma
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
$\mu\text{m}$	micrometro
>	maior que
<	menor que
$\leq$	menor ou igual a
%	porcento

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Cobaia após o sacrifício e laringectomia total .....	23
<b>Figura 2</b>	Peça da laringectomia dividida em duas hemilaringes simétricas .....	24
<b>Figura 3</b>	Cada hemilaringe foi seccionada de forma a conter a prega vocal e tecido 3mm acima e abaixo dela .....	25
<b>Figura 4</b>	Corte histológico transversal da prega vocal injetada por HCa, após 3 semanas do procedimento. Observam-se células gigantes multinucleadas (seta) envolvendo o material injetado (aumento: 400x) .....	34
<b>Figura 5</b>	Corte histológico transversal da prega vocal injetada por BPCA, após 3 semanas do procedimento. Observa-se o infiltrado inflamatório predominante por células do tipo PMN, especialmente eosinófilos (seta preta). Nota-se também a presença de neoformação vascular dentro do material injetado (seta branca) (aumento: 400x) .....	35
<b>Figura 6</b>	Corte histológico transversal da prega vocal injetada por BPCA, após 12 semanas do procedimento. Observa-se a presença de fibrose no leito cirúrgico sob a forma de fibras colágenas (seta) (aumento: 400x) .....	36
<b>Figura 7</b>	Corte histológico transversal da prega vocal injetada com BPCA, após 3 semanas do procedimento. Observa-se uma visão panorâmica da prega vocal, com mucosa íntegra, sem infiltrado inflamatório ou fibrose subepitelial (aumento: 100x) .....	39
<b>Figura 8</b>	Corte histológico transversal da prega vocal injetada com HCa, após 12 semanas do procedimento. Observa-se uma visão panorâmica da prega vocal, com mucosa íntegra, sem infiltrado inflamatório importante ou fibrose subepitelial (aumento: 40x) .....	40

**Figura 9** Corte histológico transversal da prega vocal injetada com HCa, após 12 semanas do procedimento. Observa-se uma visão detalhada da mucosa vocal, com estruturas íntegras e normais, sem infiltrado inflamatório ou fibrose subepitelial (aumento: 400x) .....

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Presença de material injetado na ocasião do sacrifício, no grupo de coelhos estudados 3 e 12 semanas após a injeção	31
<b>Tabela 2</b>	Infiltrado inflamatório da reação ao material injetado, 3 semanas após a injeção .....	32
<b>Tabela 3</b>	Infiltrado inflamatório da reação ao material injetado 12 semanas após a injeção .....	33
<b>Tabela 4</b>	Presença de fibrose e angiogênese 3 semanas após aplicação de HCa e BPCA .....	36
<b>Tabela 5</b>	Presença de fibrose e angiogênese 12 semanas após aplicação de HCa e BPCA .....	37
<b>Tabela 6</b>	Alterações na mucosa vocal 3 semanas após a aplicação de HCa e BPCA .....	38
<b>Tabela 7</b>	Alterações na mucosa vocal 12 semanas após a aplicação de HCa e BPCA .....	38

## RESUMO

Vasconcelos SJ. Efeito da injeção do biopolímero da cana-de-açúcar na prega vocal de coelhos: estudo comparativo com a hidroxiapatita de cálcio [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

A insuficiência glótica é uma condição clínica caracterizada pelo fechamento inadequado das pregas vocais durante a fonação ou a deglutição. Nos casos mais leves, os pacientes são geralmente encaminhados para tratamento fonoterápico. Nos casos com sintomas mais importantes ou insucesso na fonoterapia, o tratamento cirúrgico se faz necessário. A melhor abordagem cirúrgica para a insuficiência glótica vem sendo debatida há mais de um século. As injeções laringoplásticas são procedimentos tecnicamente simples e com possibilidade de realização sob regime ambulatorial, no entanto seus resultados não são sempre previsíveis. Esses procedimentos também trazem consigo a possibilidade de rigidez da mucosa vocal por causa da reação inflamatória ao material utilizado. Apesar do crescente interesse por procedimentos ambulatoriais na laringologia e da popularização das injeções laringoplásticas, é sabido que se carece de materiais de melhor qualidade para resultados ainda mais consistentes. O surgimento do biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) e as pesquisas sobre seu uso em outras especialidades médicas apontaram para a possibilidade de que o referido material possa ser adequado ao uso nas injeções laringoplásticas. O presente trabalho foi desenvolvido para estudar a reação inflamatória causada pela injeção do BPCA na prega vocal de coelhos e comparar com a reação causada pela hidroxiapatita de cálcio (HCa). Para tal, foi procedida a injeção de 0,1mL HCa e BPCA na forma de gel nas pregas vocais direita e esquerda, respectivamente, de coelhos machos adultos da raça *Oryctolagus cuniculus*. Os coelhos foram divididos em dois grupos de 15, os quais foram sacrificados com 3 e 12 semanas. Após o sacrifício, foi feita a remoção e o processamento do material a ser estudado. Nos cortes histológicos foram avaliados os parâmetros de intensidade e composição celular do processo inflamatório, neovascularização, fibrogênese e alterações inflamatórias na mucosa vocal. Observou-se que a HCa e o BPCA desencadearam reação inflamatória por células do grupo linfomononuclear semelhantes em ambos os períodos analisados. A HCa desencadeou uma reação inflamatória por células gigantes intensa em todas as amostras e significativamente mais importante que o BPCA em ambos os períodos estudados. O BPCA apresentou reação inflamatória por células do grupo polimorfonucleares mais intensa do que a HCa apenas 3 semanas após a injeção. Não houve diferença entre as duas substâncias no que concerne à formação de tecido fibroso no leito cirúrgico após 3 e 12 semanas. Houve uma maior neoformação vascular com a injeção de BPCA comparado com a

HCa após 3 semanas do procedimento. Não houve diferença estatística nessa variável após 12 semanas. Com relação às alterações inflamatórias da mucosa, não houve diferença significativa entre as substâncias nos três parâmetros estudados: integridade do epitélio, infiltrado inflamatório e presença de fibras colágenas na região submucosa. Conclui-se que, enquanto a HCa desencadeia uma reação inflamatória mediada por células gigantes, mais intensa e duradoura, o BPCA apresenta uma resposta por polimorfonucleares, assim como uma neoformação vascular mais importantes apenas após 3 semanas da injeção. Outros estudos devem ser realizados para avaliar o potencial do uso do BPCA no tratamento da insuficiência glótica.

**Descritores:** 1. Prega Vocal 2. Disfonia 3. Laringoplastia 4. Biopolímeros  
5. Hidroxiapatita de Cálcio 6. Coelhos

## ABSTRACT

Vasconcelos SJ. Effect of sugarcane biopolymer injected in rabbit vocal fold: Comparative Study with Calcium Hydroxyapatite [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

The glottal insufficiency is a clinical condition featured by abnormal closure of vocal folds during the process of phonation or deglutition. In most mild, cases patients are usually referred to speech therapy. In those cases presenting more relevant symptoms or failure in speech therapy, the surgical procedure is mandatory. The best surgical approach for glottal insufficiency has been debated over the past one hundred years. Laryngoplastic injections are technically simple procedures and possible to be performed in an outpatient basis, however their results are not always predictable. Such procedures may also present stiffness in the vocal mucosa due to the inflammatory reaction to the material which has been used. Despite of the fact that the growing interest in outpatient basis procedures in laryngology as well as the popularization of laryngoplastic injections, it is well known the lack of better quality materials for inducing much more consistent results. The arising of sugarcane biopolymer (SCB) along with researches on its use in other medical specialties demonstrated that there is a possibility for adequately using the mentioned material in laryngoplastic injections. The present work has been developed for the purpose of studying the inflammatory reaction which is caused by sugarcane biopolymer (SCB) injected in rabbits vocal folds as well as comparing to that reaction caused by calcium hydroxyapatite (HCa). For this experiment adult male rabbits from the race *Oryctolagus cuniculus* have been used, thus, 0.1 ml of HCa and of SCB in gel form were injected in their right and left vocal folds respectively. Rabbits have been divided into two groups of 15 each which were sacrificed at 3 and 12 weeks. After sacrifice, the vocal cords were removed and processed in order to be studied. Parameters as intensity and cellular composition in the inflammatory process, neovascularization, fibrogenesis as well as inflammatory alterations of vocal mucosa have been analyzed in histological pieces. It has been observed that HCa and SCB triggered an inflammatory reaction by lymphomononuclear group cells which are similar in the analysis of both periods. HCa triggered an inflammatory reaction by giant cells being intense in all of the samples and significantly more relevant as compared to SCB in the study of both periods. SCB presented an inflammatory reaction by polymorphonuclear group cells which was more intense as compared to HCa in just three weeks after injection. There was no difference between the two substances concerning the fibrous tissue building-up after three and twelve weeks. There was a larger vascular neoformation when injecting SCB as compared to HCa

injection three weeks after procedure. There was no statistical difference in such a variable after twelve weeks. In respect of mucosa inflammatory changes, there was no significant difference between the substances by studying those three parameters as follows: epithelial integrity, inflammatory infiltrate and the presence of collagenous fibers in the submucosal region. In conclusion, while HCa triggers an inflammatory reaction mediated by giant cells which is more intense and lasting, SCB in its turn presents a more prevalent response by polymorphonuclear cells as well as by a vascular neof ormation just three weeks after injection. Other studies should be done in order to evaluate the potential use of SCB in treating glottal insufficiency.

**Descriptors:** 1. Vocal Cord 2. Dysphonia 3. Laryngoplasty 4. Biopolymers  
5. Hydroxyapatites calcium 6. Rabbits

# 1 INTRODUÇÃO

## 1 INTRODUÇÃO

A insuficiência glótica é uma condição frequente na otorrinolaringologia e comum em uma série de afecções. Nesses casos, a coaptação entre as pregas vocais se mostra ineficiente, alterando os diversos aspectos da fisiologia da laringe. Há prejuízo no controle de vários fatores relacionados à produção normal da fala, como a pressão subglótica e a formação da onda mucosa na prega vocal. Também pode haver deficiência na proteção das vias aéreas inferiores durante a deglutição, com risco de aspiração e complicações, a exemplo da pneumonia aspirativa. O referido quadro implica em prejuízo à qualidade de vida, assim como influencia negativamente no índice de morbimortalidade desses pacientes<sup>(1)</sup>.

Apesar dos avanços obtidos em laringologia nas últimas décadas, ainda não se conseguiu desenvolver uma terapêutica ideal para os casos de insuficiência glótica. Uma alternativa diz respeito às cirurgias de medialização da prega vocal por injeção de certos materiais em seu interior, conhecidas como injeções laringoplásticas (IL). Tais injeções apresentam como vantagem a execução fácil e o tempo cirúrgico curto. Não há, no entanto, um material que se mostre ideal para tal procedimento<sup>(2)</sup>. Nos casos em que se opta por um procedimento de medialização em longo prazo da prega vocal, os materiais disponíveis costumam desencadear reações inflamatórias locais, as quais podem resultar em sequelas estruturais no epitélio e na lâmina própria da prega vocal. Em alguns casos, há uma redução importante na capacidade vibratória do epitélio vocal, sendo esta indispensável para emissão de uma voz agradável e adequada para as funções cotidianas<sup>(3)</sup>.

Cumprido, outrossim, mencionar que os materiais usados correspondem a enxertos (gordura, fáscia, tecido conjuntivo areolar perifascial, etc.) e implantes diversos<sup>(4,5)</sup>. Com relação aos enxertos, a limitação é o índice alto de reabsorção em prazos curto ou médio, com recorrência dos sintomas. No caso dos implantes, os fatores limitantes são o custo dos materiais disponíveis no mercado e a reação inflamatória causada por pelos mesmos<sup>(6,7)</sup>.

Por fim, convém reconhecer que a descoberta recente de um biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar abriu um campo de pesquisa importante para cirurgias funcionais<sup>(8)</sup>. Com a possibilidade de atender os pré-requisitos de um enxerto adequado para a utilização em IL, o biopolímero poderia associar complexidade técnica baixa com resultados funcionais prometedores, o que motivou a realização da presente pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Primário**

- Avaliar a reação inflamatória induzida pela injeção de biopolímero na prega vocal de coelhos após 3 e 12 semanas do procedimento.

### **2.2 Objetivo Secundário**

- Comparar a reação causada pela injeção de biopolímero com a reação causada pela injeção de hidroxiapatita de cálcio (Radiesse<sup>®</sup>), em cada etapa.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Fisiologia laríngea e Insuficiência glótica

A laringe desempenha funções importantes para o ser humano, e é oportuno destacar a necessidade de atender a alguns requisitos para seu funcionamento adequado, tais como a inervação preservada, a boa função muscular e a integridade estrutural da prega vocal e de suas camadas. Como resultado, é possível controlar a posição e o tônus das pregas vocais, algo indispensável para garantir um fechamento adequado ao nível da glote<sup>(9,10)</sup>.

Segundo Giraldez-Rodriguez e Johns<sup>(1)</sup>, a insuficiência glótica é a condição caracterizada pela não coaptação adequada das pregas vocais durante a fonação ou a deglutição, o que pode alterar uma série de funções primordiais da laringe. Como consequência, o paciente pode apresentar transtornos como disfonia e disfagia, além das condições de comorbidade e mortalidade a elas associadas. A insuficiência glótica não é uma afecção em si, mas uma condição comum a uma série de doenças laríngeas ou sistêmicas. Dentre as mais comuns, destacam-se as paralisias de uma ou de ambas as pregas vocais (secundárias ou idiopáticas), as sequelas de cirurgias da laringe, condições neurológicas diversas, além do efeito da idade sobre esse órgão, também conhecida como presbilaringe<sup>(11-13)</sup>.

### 3.2 Tratamento da insuficiência glótica

Dentre os possíveis tratamentos da insuficiência glótica Misono e Merati<sup>(11)</sup> citam duas modalidades principais. Nos casos com sintomas vocais mais leves e sem risco significativamente alto de aspiração de alimentos, é indicado o tratamento fonoterápico, com grau de evidência baixo em relação à sua efetividade. É nos casos mais graves, ou não responsivos ao tratamento fonoterápico, que se indica o tratamento cirúrgico, cujos resultados positivos apresentam maior grau de evidência. Para esse tipo de paciente, os autores citam dois tipos principais de abordagens para o tratamento da insuficiência glótica, quais sejam, as cirurgias do arcabouço laríngeos e as injeções laringoplásticas.

As cirurgias do arcabouço laríngeo foram inicialmente descritas há quase um século por Payr<sup>(14)</sup>, que utilizou um flap de cartilagem pressionada medialmente a partir de uma janela na cartilagem tireoide. Desenvolvida em uma época anterior ao uso de antibióticos e corticosteroides, a técnica foi abandonada pelo seu índice elevado de complicações<sup>(15)</sup>. As técnicas de cirurgia do arcabouço laríngeo foram reintroduzidas na prática médica e modificadas há quatro décadas por Isshiki et al.<sup>(17)</sup>. Nessa ocasião, os autores propuseram a tireoplastia tipo 1 para o tratamento da insuficiência glótica. Nela, o cirurgião provocaria o deslocamento medial da prega vocal mediante pressão exercida sobre uma janela na lâmina da cartilagem tireóidea do lado afetado. A tireoplastia tipo 1 tem como vantagem a possibilidade de ajuste do grau de medialização da prega vocal durante o transoperatório, além da possibilidade de realização do procedimento com anestesia local<sup>(16)</sup>.

Considerada como padrão-ouro para a correção de insuficiência glótica por algumas escolas de laringologia, a tireoplastia tipo 1 de Isshiki <sup>(16)</sup> também merece ressalvas. A taxa de complicações nesse tipo de cirurgia, apesar de baixa, não chega a ser inexpressiva. Young et al. <sup>(18)</sup> realizaram um levantamento com mais de seis mil otorrinolaringologistas nos EUA, computando dados sobre tireoplastias tipo 1 realizadas nos últimos 10 anos pelos entrevistados. Os autores contabilizaram uma taxa de 0,8% de extrusão de implante, além de complicações como infecções de ferida operatória, abertura inadvertida da via aérea, fístula e tecido de granulação em 2,2% dos casos. A taxa de procedimentos revisionais foi de 6%.

Como exposto, trata-se de procedimento laborioso, o qual requer considerável habilidade e experiência por parte do cirurgião, para aperfeiçoar os resultados e diminuir o índice de complicações. Ainda, no trabalho de Young et al. <sup>(18)</sup>, o índice de complicações é expressivamente reduzido, quando a quantidade de tireoplastias tipo 1, realizadas pelos cirurgiões ao longo de sua carreira, excede um total de 30 procedimentos. Segundo os autores, a quantidade de complicações era significativamente maior para cirurgiões que realizavam menos de três procedimentos por ano.

A tireoplastia tipo 1, mesmo sendo feita sob anestesia local, demanda uma incisão cervical de aproximadamente 5cm, o que, por si só, já traz alguns inconvenientes, a exemplo da questão estética envolvida, tão em moda atualmente. Mesmo discreta, uma cicatriz na região cervical anterior pode ser algo indesejável para muitas pessoas. Isso tem motivado cirurgiões de cabeça e pescoço a buscarem abordagens diferentes para as cirurgias de tireoide, as quais tem um acesso bem parecido com o utilizado na tireoplastia <sup>(19)</sup>. Algumas comorbidades podem

inviabilizar o procedimento ou aumentar o risco de complicações. Em revisão de literatura, Tibbs<sup>(20)</sup> destaca o efeito deletério da radioterapia na cicatrização de feridas cirúrgicas de pele. Guo e DiPietro<sup>(21)</sup> citam a quimioterapia como um fator importante de alteração na fisiologia da cicatrização de feridas cirúrgicas. Segundo os autores, a quimioterapia aumenta a chance de complicações em cirurgias que demandem incisão cutânea, a exemplo das tireoplastias.

A segunda opção de tratamento cirúrgico para a insuficiência glótica refere-se às medializações de uma ou ambas as pregas vocais, por meio de injeções de materiais, orgânicos ou não. A IL para o tratamento da insuficiência glótica foi preconizada inicialmente por Bruning há mais de 100 anos, como citam Misono e Merati<sup>(11)</sup>, quando foi utilizada parafina em um paciente com paralisia unilateral de prega vocal. Sob o ponto de vista técnico, o procedimento é bem mais simples, rápido e menos invasivo que a tireoplastia. Como descrevem Rosen e Mallur<sup>(2)</sup>, não há incisão, mas apenas a introdução de uma agulha de calibre médio no pescoço do paciente ou através da cavidade oral. Essa injeção pode ser feita sob anestesia local e em caráter ambulatorial. Como ponto negativo destaca-se o ajuste mais difícil do grau de medialização da prega vocal durante a realização do procedimento, se comparado com a tireoplastia tipo 1. Uma vez injetado o material, não se consegue retirá-lo sem uma abordagem cirúrgica diversa. Segundo os autores, não há contraindicação para a realização da IL, mesmo após radioterapia ou na vigência de anticoagulação ou quimioterapia, embora no primeiro caso o procedimento possa ser tecnicamente mais difícil.

Outra desvantagem na IL diz respeito ao material a ser utilizado para a injeção, o que merece uma análise à parte.

### 3.3 Materiais usados na IL

A parafina pode ter sido o primeiro material utilizado nas laringoplastias, porém foi gradativamente abandonada até o surgimento de novas substâncias, possivelmente biocompatíveis<sup>(11)</sup>. Segundo Rosen et al.<sup>(22)</sup>, a substância ideal para tais procedimentos tem as características seguintes: biologicamente inerte, ser disponível em uma forma pronta para o uso, não apresentar risco de transmissão de doenças infecciosas, boa interação reológica com o tecido receptor e ser disponível para o uso em uma agulha com calibre não muito grosso.

Os materiais podem ser classificados de formas diversas, porém a classificação mais importante diz respeito ao tempo de permanência dos mesmos na prega vocal, por ter influência na prática clínica. King e Simpson<sup>(7)</sup> pontuam a importância do prognóstico da insuficiência glótica na escolha do material para a IL. Nos casos em que se deseja um ganho não permanente, a injeção de um material de ação por tempo reduzido é especialmente atraente. Um exemplo citado pelos autores diz respeito aos casos de paralisia unilateral de laringe com início recente. Materiais reabsorvíveis em no máximo seis meses, citados no artigo, e já utilizados em alguns países são o ácido hialurônico, o colágeno humano, o colágeno bovino e o *gelfoam*. Nos casos em que o evento que levou à insuficiência glótica é de caráter permanente busca-se uma terapêutica capaz de trazer resultados em longo prazo.

No que diz respeito às IL, dispõe-se de alguns poucos materiais que possibilitam uma medialização em longo prazo. A gordura vem sendo usada com a vantagem de ser um enxerto autólogo e de baixo custo; no entanto, sua duração e resultados são pouco previsíveis<sup>(5)</sup>. Outrora era muito utilizado o Teflon<sup>®</sup>, que vem

caindo em desuso por conta de seu risco de formação de granulomas e pela rigidez que causa no tecido injetado, o que traz ao paciente uma perda importante da qualidade vocal<sup>(23,24)</sup>.

### **3.4 Hidroxiapatita de cálcio nas IL**

Um novo material vem sendo utilizado para medialização de pregas vocais na última década. Feito a partir de microesferas de hidroxiapatita de cálcio (HCa) com 25µm a 45µm de diâmetro, suspensas em um gel aquoso com glicerina e carbometilcelulose (Radiesse<sup>®</sup>), que foi inicialmente descrito por Rosen e Thekdi<sup>(25)</sup> para tratamento da insuficiência glótica. Nesse trabalho, os autores referem melhora no índice que permite avaliar a percepção dos cinco pacientes sobre sua própria voz, após terem sido submetidos à IL com HCa e acompanhados até o fim da pesquisa. Em quatro desses pacientes houve melhora significativa nos padrões aerodinâmicos da voz. No acompanhamento de seis meses após a injeção, não houve casos de migração do material, deterioração dos resultados obtidos ou redução da onda mucosa.

Outros trabalhos publicados desde então mostraram não só bons resultados funcionais com a aplicação desse material, como também índices relativamente baixos de complicação. Belafsky e Postma<sup>(26)</sup> estudaram 23 pacientes submetidos à IL com HCa. Foi observada melhora no índice que permite avaliar a percepção do paciente sobre sua própria voz (*Voice Handicap Index - VHI*) em todos os indivíduos submetidos à IL com HCa, para tratamento de insuficiência glótica. No estudo, os

autores não referiram reação adversa, sinais de rigidez ou inflamação nas pregas vocais injetadas.

Em um estudo multicêntrico e prospectivo com 68 pacientes, Rosen et al.<sup>(22)</sup> observaram melhora significativa nos parâmetros vocais e videoestroboscópicos em pacientes submetidos à IL com HCa. Nenhuma complicação maior como insuficiência respiratória aguda foi anotada. Em 12% dos pacientes, no entanto, foi necessária uma nova intervenção para tratamento da insuficiência glótica.

Resultados apresentados por Woo et al.<sup>(27)</sup> também se mostraram positivos mesmo quando foram comparadas duas técnicas diferentes de IL com HCa: a injeção entre as cartilagens cricoide e tireoide; e, a injeção entre a cartilagem tireoide e o osso hioide. Nesse trabalho, tanto os parâmetros objetivos quanto os subjetivos, relativos à análise vocal dos pacientes, mostraram uma significativa melhora com ambas as técnicas.

Há alguns questionamentos no que concerne ao uso de tal material na prática clínica, mesmo apresentando os pontos positivos já citados. Pesa contra a HCa o fato dela apresentar índice de rigidez e viscosidade altos em relação a outros materiais injetáveis, como mostram Kimura et al.<sup>(28)</sup>. Tal característica faz com que sua injeção acidental em locais muito próximos à mucosa vocal possa resultar em alteração das propriedades físicas do espaço de Reinke e da mucosa vocal.

As complicações decorrentes do uso da HCa em IL, mesmo infrequentes, podem ser bastante danosas à qualidade vocal dos pacientes. DeFatta, Chowdhury e Sataloff<sup>(3)</sup> descrevem complicações em 16 pacientes submetidos à IL com HCa. Migração indesejada do material injetado, formação de tecido de granulação no sítio

cirúrgico e dano irreversível à onda mucosa na prega vocal, foram algumas das complicações descritas no artigo. Foi necessária a realização de cordotomia lateral para remoção da HCa injetada em seis pacientes, com melhora da onda mucosa em cinco desses pacientes.

### **3.5 Biopolímero de cana-de-açúcar**

Os polímeros baseados em carboidratos têm sido estudados há mais de 80 anos e originaram materiais usados em diversas áreas da indústria. Desde o princípio, tais polímeros mostram características que os tornam particularmente promissores para o uso em medicina, especialmente pelo fato de serem biodegradáveis e biocompatíveis<sup>(29)</sup>.

Um heteropolissacarídeo extracelular foi obtido mediante síntese bacteriana (*Zoogloea sp.*), a partir do melaço de cana-de-açúcar na estação experimental de cana-de-açúcar de Carpina, divisão de indústria da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A identificação do microrganismo produtor do polissacarídeo foi feita no Instituto de Antibióticos da UFPE. Após sua produção, o referido polissacarídeo foi hidrolisado em duas fases, uma delas feita com o ácido trifluoroacético, que resultou em 88% de material solúvel, conhecida como fase a frio. Uma segunda fase, ou fase a quente, resultou em 100% de hidrólise do material e os componentes foram expressos com respectivas concentrações que somam 100%, o que demonstra a pureza do produto. Os monossacarídeos principais presentes na

fração solúvel foram: glicose (87,6%), xilose (8,6%), ribose (1,7%), ácido glicurônico (0,8%), manose (0,8%), arabinose (0,4%) e galactose (0,1%)<sup>(8)</sup>.

O biopolímero de cana-de-açúcar (BPCA) foi utilizado pela primeira vez, vislumbrando o uso em medicina, para a cicatrização de feridas de animais tratados no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os autores consideraram que, nos animais cujas feridas receberam um filme de BPCA, houve aumento do tecido de granulação, além de redução na secreção da ferida e no tempo de cicatrização. Em virtude dos achados, os autores sugeriram que o BPCA contribui para o processo cicatricial, podendo ser utilizado em feridas cutâneas de animais<sup>(30)</sup>.

O BPCA tem sido avaliado não só quanto a sua viabilidade, mas também como alternativa aos materiais já consagrados pela prática clínica. Em um estudo com ratas, Lucena et al.<sup>(31)</sup> avaliaram a utilização de BPCA na confecção de um dispositivo de suporte para o tratamento de incontinência urinária, em comparação com tela de prolene<sup>TM</sup>. Os achados mostraram que além de ser um material estável e de fácil manipulação, o BPCA apresentou reação tissular mínima e incorporação adequada ao hospedeiro.

Lima et al.<sup>(32)</sup> compararam o BPCA com o polipropileno na confecção de telas para correção de defeitos da parede abdominal, em um estudo realizado com ratos. Os autores não observaram diferenças significativas entre os dois materiais no que diz respeito à aderência, à incorporação do material utilizado e aos índices de infecção.

O BCPA já foi estudado também em otorrinolaringologia. Uma membrana feita com esse material foi testada como enxerto livre no reparo de perfurações na membrana timpânica de roedores da espécie *Chinchilla laniger*. Os resultados obtidos foram comparados com igual procedimento ao utilizar como enxerto livre a fásia autóloga, a qual é amplamente aplicada na prática clínica. Os resultados mostraram não haver redução da taxa de sucesso no tratamento das perfurações de membrana timpânica, quando utilizada membrana de BPCA em *Chinchilla laniger*<sup>(33)</sup>.

No campo da neurocirurgia o BPCA foi estudado como substituto da dura-máter. Em tese defendida em 2008, Lima<sup>(34)</sup> comparou uma tela de BPCA com uma tela à base de monômeros de tetrafluoroetileno no reparo de defeitos da dura-máter. O pesquisador não apenas sugeriu que o biopolímero pode ser utilizado como material para reconstrução da dura-máter em ratos, como observou algo muito interessante: o BPCA não é somente reabsorvido, mas também substituído por tecido conjuntivo no leito receptor do enxerto. Isso pode garantir a manutenção do efeito de massa do enxerto no local, algo bastante desejado em algumas circunstâncias em medicina.

O BPCA também foi desenvolvido na forma gel, bastante atraente ao uso para correção da incompetência glótica. Em experimento recente utilizando coelhos, Cordeiro-Barbosa et al.<sup>(35)</sup> estudaram o uso desse composto em gel, no tratamento da evisceração ocular. As cavidades esclerocorneais removidas foram preenchidas com gel de BPCA esterilizado por radiação gama. Não houve casos de infecção ou sinais de necrose e liquefação. Foi observado que a partir do trigésimo dia surgiram sinais

de reabsorção do BPCA, associada à proliferação vascular e deposição de colágeno no local implantado em todos os espécimes estudados, o que reforça a ideia da substituição do BPCA por tecido conjuntivo.

Em estudo publicado recentemente, Leão et al.<sup>(36)</sup> avaliaram a reação inflamatória desencadeada pela injeção do BPCA em pregas vocais de coelhos e a compararam com a resposta decorrente do mesmo procedimento usando soro fisiológico. Após avaliarem o infiltrado inflamatório, a presença do material nas pregas vocais injetadas e a presença de fibrose e de neoformação vascular após três e doze semanas, os autores concluíram que os resultados foram promissores para o uso de BPCA em IL. Cumpre salientar que o referido estudo não analisou a integridade da mucosa vocal.

### **3.6 Resultados obtidos com a IL e com as tireoplastias**

Encontram-se na literatura trabalhos que comparam os resultados funcionais obtidos por duas abordagens cirúrgicas para o tratamento da insuficiência glótica. Quando comparados os resultados obtidos por injeção de gordura na prega vocal com os resultados obtidos com tireoplastias tipo 1, Umeno et al.<sup>(37)</sup> não encontraram diferenças significativas entre as duas abordagens. Pelo fato da laringoplastia com injeção de gordura ser usualmente feita em centro cirúrgico e sob anestesia geral, além de ter uma taxa de absorção pouco previsível, ela não costuma ser um procedimento padrão-ouro para essa finalidade<sup>(7)</sup>.

A HCa injetável, como material para tratamento de insuficiência glótica de longa duração (>12 meses), já foi comparada com a tireoplastia tipo 1 de Isshiki<sup>(16)</sup>, quanto aos resultados funcionais das duas técnicas. Em uma metanálise publicada recentemente, Shen et al.<sup>(38)</sup> compararam os ganhos obtidos em um índice que pontua a voz do paciente segundo a sua qualidade e funcionalidade VHI após cada procedimento. Outro parâmetro estudado foi a variação no tempo fonatório máximo. Segundo o estudo, os resultados obtidos com tireoplastia tipo 1 sem rotação de aritenóide não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com aqueles obtidos pela IL com HCa para os parâmetros citados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local do estudo**

A criação e o confinamento dos animais foram realizados no biotério da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE, Recife. A análise histológica das peças foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da referida universidade.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da UFPE e da USP (Apêndices 1 e 2).

### **4.2 Tipo do estudo**

Trata-se de um estudo experimental exploratório e analítico, com amostras pareadas.

### **4.3 Seleção e confinamento dos animais**

Foram utilizados 30 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, adultos jovens, do gênero masculino, massa corporal mínima 2,5kg, bom estado nutricional, provenientes do biotério da UFPE, Recife.

Os animais foram mantidos no Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE segundo as normas éticas de cuidados com os animais de laboratório. Os coelhos permaneceram em gaiolas individuais, com livre acesso à água e à ração comercial padronizada, não necessitando de jejum pré-operatório. O protocolo foi realizado de acordo com as normas da comissão de ética do Núcleo de Cirurgia Experimental da UFPE.

#### **4.4 Técnica cirúrgica**

Os procedimentos de injeção de BPCA e de HCa foram realizados sob anestesia geral, com o animal fixado na mesa cirúrgica. Antes do procedimento cirúrgico foi determinada a massa corporal dos animais e foram identificados. O procedimento anestésico foi feito com solução anestésica composta de cloridrato de cetamina (5mg/100g de massa do animal) associado ao cloridrato de xilazina (2mg/100g de massa do animal). Dez minutos antes do início da anestesia, foi aplicado sulfato de atropina por via intramuscular (0,44mg/kg). O animal foi mantido sob insuflação de oxigênio (0,5mL/min) administrado por meio de máscara, durante o preparo, e logo após a execução do procedimento. Foi considerado anestesiado o animal com respiração regular e com ausência de reflexos a estímulos.

Uma vez anestesiado, o coelho foi colocado na posição de decúbito dorsal. A laringoscopia direta foi realizada por introdução de um espéculo nasal autostático, com lâmina de 70mm, marca Ferrari, para cirurgia de hipófise. A iluminação da laringe, através do espéculo, foi feita por fotóforo frontal com fonte de luz alógena.

As pregas vocais dos coelhos foram visualizadas com auxílio do espéculo nasal. Na ocasião, o animal respirava de modo espontâneo, sem necessidade de intubação orotraqueal. À disposição, havia duas seringas de 1mL conectadas a uma agulha de raqui número 25, as quais continham HCa (Radiesse<sup>®</sup>) em uma e BPCA em gel (hidrogel de polissacarídeo a 1%) previamente esterilizado por radiação gama, em outra. Por visualização direta foi feita a injeção de 0,1mL HCa sempre nas pregas vocais direitas, bem como de 0,1mL do gel de BPCA nas pregas vocais esquerdas dos espécimes. Todas as aplicações nas pregas vocais dos coelhos eram feitas na topografia correspondente à indicada para IL com HCa nos humanos.

No que tange ao grau de dificuldade, não se notou diferença entre a aplicação nas pregas vocais, direita e esquerda, importando salientar que o lado injetado primeiramente variava entre os coelhos. Se em um coelho o lado inicialmente injetado era o direito, no coelho seguinte iniciava-se pelo lado esquerdo. A ordem dos coelhos submetidos ao procedimento foi randomizada pela médica veterinária que assistia ao experimento, sem participação do pesquisador.

Logo após a injeção, os coelhos foram mantidos em confinamento no biotério do núcleo de cirurgia experimental da UFPE e, em seguida, aleatoriamente divididos em dois grupos. No Grupo 1, o sacrifício dos animais e a coleta do material foram realizados 3 semanas após a injeção; no Grupo 2, por seu turno, os mesmos procedimentos foram realizados 12 semanas após a injeção.

Em ambos os grupos, a eutanásia dos animais foi realizada mediante administração, por via intracardíaca de dose letal de tiopental sódico, na dose de 150mg/kg. Só após o óbito do animal, atestado pela médica veterinária que

acompanhava o procedimento, foi iniciada a coleta do material. Foi feita a tricotomia na região cervical anterior do coelho e, em seguida, uma incisão cervical vertical, com dissecção por planos até a realização de laringectomia total no coelho (Figura 1). A laringe removida do coelho foi lavada com soro fisiológico e colocada em formol tamponado, e encaminhada para o preparo e estudo histológico.

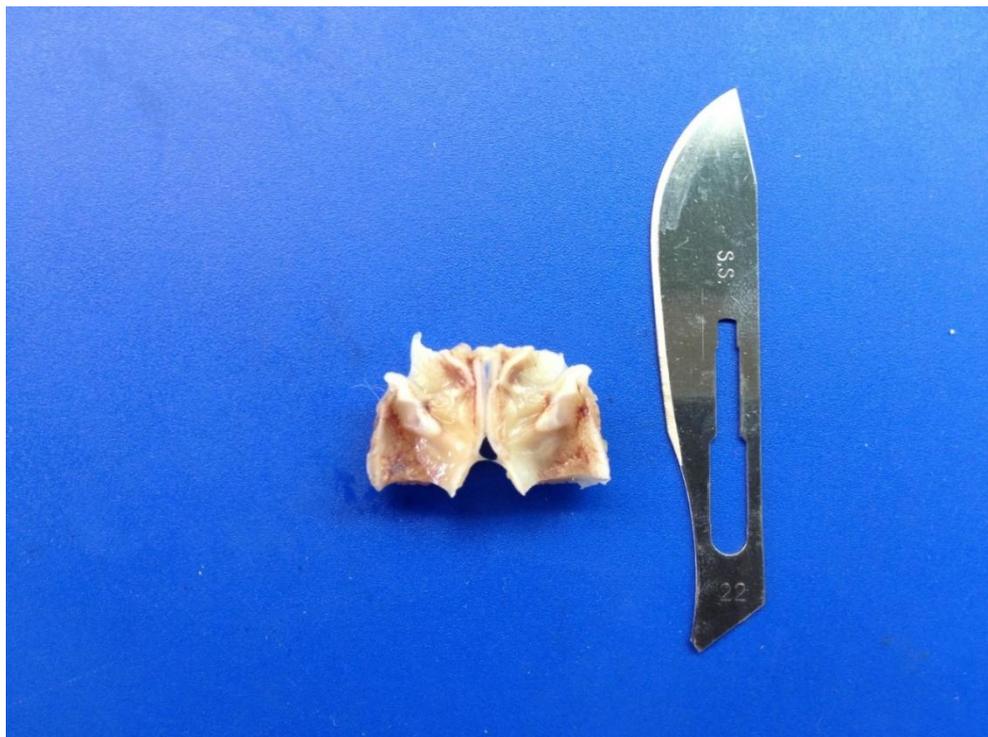


**Figura 1** - Coelho após o sacrifício e a laringectomia total.

#### **4.5 Preparação para o estudo histológico**

A laringe removida permaneceu em formol tamponado por 48 horas. Após esse tempo a peça foi lavada com soro fisiológico e, em seguida, seccionada na linha média em duas hemilaringes simétricas (Figura 2). Cada hemilaringe foi seccionada

horizontalmente 3mm abaixo e 3mm acima das pregas vocais, e apenas o fragmento que continha as pregas vocais foi utilizado (Figura 3). Cada peça, que continha uma prega vocal foi individualizada e seguiu para fixação.



**Figura 2** - Peça da laringectomia dividida em duas hemilaringes simétricas.



**Figura 3** - Cada hemilaringe foi seccionada de forma a conter a prega vocal e tecido 3mm acima e abaixo dela.

#### **4.6 Confeção das lâminas para o estudo histológico**

Uma vez preparada e identificada cada prega vocal, iniciou-se o processo de confecção das lâminas para o estudo histológico. Cada peça anatômica foi lavada em água destilada, no mínimo 10 vezes, para remoção de todo o formol tamponado.

Depois de lavadas diversas vezes, as peças foram submetidas a um processo de desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes de 70%, 80%, 90% e 100%. Em seguida, foi realizada a diafanização com solução de álcool xilol 50%, em temperatura ambiente, por um período de 25min. O mesmo processo foi então repetido, só que com solução de álcool xilol 100%. Após embrocção em parafina as amostras seguiram para a microtomia.

As pregas vocais nas quais foi injetado o BPCA seguiram para a microtomia com micrótopo e lâmina tradicionais. Nas pregas vocais, nas quais foi injetada a HCa a microtomia foi feita com micrótopo da marca Leika com lâmina de diamante. Após apropriadamente preparadas, as lâminas elas foram coradas com as colorações de hematoxilina e eosina, bem como tricromo de Masson.

#### **4.7 Estudo histológico**

A avaliação das lâminas foi realizada no Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Foram avaliados os parâmetros de intensidade e infiltrado inflamatório da reação, presença de neovascularização, presença de fibrose e presença de alterações inflamatórias na mucosa vocal.

Quanto ao infiltrado inflamatório na reação desencadeada pela injeção, foi pesquisada a presença dos tipos celulares seguintes: linfomononucleares, células gigantes e polimorfonucleares. A mucosa vocal foi avaliada sob três aspectos: a integridade do epitélio; o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subepitelial (córion); e, a presença de fibras colágenas na porção subepitelial da mucosa. Esses parâmetros da mucosa serão descritos respectivamente como: mucosa-revestimento; mucosa-inflamação; e, mucosa-fibrose.

As variáveis histológicas foram classificadas da forma seguinte:

**1) Infiltrado inflamatório linfomononuclear (LMN):**

Score 0: Ausente;

Score 1: Leve: < 10% da área ocupada por células inflamatórias;

Score 2: Moderado: 11-50% da área ocupada por células Inflamatórias;

Score 3: Intenso: >50% da área ocupada por células inflamatórias.

**2) Células Gigantes (CG):**

Score 0: Ausente;

Score 1: Leve: <10% da área ocupada por células inflamatórias;

Score 2: Moderado: 11-50% da área ocupada por células inflamatórias;

Score 3: Intenso: >50% da área ocupada por células inflamatórias.

**3) Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN):**

Score 0: Ausente;

Score 1: Leve: <10% da área ocupada por células inflamatórias;

Score 2: Moderado: 11-50% da área ocupada por células Inflamatórias;

Score 3: Intenso: >50% da área ocupada por células inflamatórias.

**4) Fibrose:**

Score 0: Ausente;

Score 1: Discreta: raras fibras em até 10% da área;

Score 2: Moderada: fibras dispersas, jovens não modeladas entre 10% e 75%;

Score 3: Intensa: fibras maduras, modeladas, 75 a 100%.

**5) Angiogênese:**

Score 0: Ausente;

Score 1: Leve;

Score 2: Moderado;

Score 3: Intenso.

**6) Mucosa – Revestimento:**

Score 0: Normal;

Score 1: Agressão inflamatória (presença de células inflamatórias permeando o epitélio, mas sem solução de continuidade);

Score 2: Erosão;

Score 3: Ulceração.

**7) Mucosa – Inflamação:**

Score 0: Ausente;

Score 1: Leve: <10% da área ocupada por células inflamatórias;

Score 2: Moderado: 11-50% da área ocupada por células Inflamatórias;

Score 3: Intenso: >50% da área ocupada por células inflamatórias.

**8) Mucosa – Fibrose:**

Score 0: Ausente;

Score 1: Discreta, raras fibras em até 10% da área;

Score 2: Moderada, fibras dispersas, jovens não modeladas entre 10% e 75%;

Score 3: Intensa, fibras maduras, modeladas, 75 a 100%.

#### **4.8 Metodologia estatística**

Para análise estatística dos dados obtidos com relação à diferença entre as frequências de HCa e BPCA encontradas após três e doze semanas, foi utilizado o

teste exato de Fisher. Para análise dos dados referentes ao estudo histológico, foi utilizado o teste de Wilcoxon.

Foi considerado como valor de significância 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Presença de HCa ou BPCA nas pregas vocais dos coelhos

De um total de 30 coelhos, 15 foram sacrificados três semanas após a injeção dos materiais e os demais, doze semanas após a injeção. Isso gerou um total de 15 laringes em ambos os grupos. Cada prega vocal direita foi avaliada quanto à presença da HCa, na mesma ocasião, cada prega vocal esquerda foi avaliada quanto à presença do BPCA. As pregas vocais nas quais o material injetado não foi encontrado, após 3 ou 12 semanas, foram excluídas do estudo.

A Tabela 1 mostra em quantas pregas vocais foi encontrado cada material injetado após 3 e 12 semanas, totalizando 15 laringes submetidas ao procedimento para cada período. Não houve diferença na quantidade de pregas vocais que continham HCa após 3 e 12 semanas ( $p=1$ ). Houve uma redução da quantidade de pregas vocais que continham BPCA no grupo em que a análise foi feita após 12 semanas, quando comparado ao grupo estudo com 3 semanas. No entanto, essa diferença não foi significativa ( $p=0,427$ ).

**Tabela 1** - Presença de material injetado na ocasião do sacrifício, no grupo de coelhos estudados 3 e 12 semanas após a injeção.

Variável analisada	Após 3 semanas	Após 12 semanas	Teste exato de Fisher
HCa	13	13	1,0
BPCA	12	09	0,427

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar

## 5.2 Achados histológicos e Comparação entre os grupos

### 5.2.1 Infiltrado inflamatório

O resultado das análises histológicas realizadas apenas nas pregas vocais nas quais foram encontrados HCa ou BPCA foi descrito após 3 e 12 semanas. Foi comparado o infiltrado inflamatório da reposta causada pela injeção de cada material, inicialmente após 3 semanas da injeção (Tabela 2) e, posteriormente, após 12 semanas da injeção (Tabela 3).

**Tabela 2** - Infiltrado inflamatório da reação ao material injetado, 3 semanas após a injeção.

Variável analisada	Variável histológica	Após 3 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 12	
Infiltrado inflamatório - LMN	0	1	0	0,7768
	1	10	8	
	2	2	4	
Infiltrado inflamatório – CG	1	0	2	0,0211
	2	0	3	
	3	13	7	
Infiltrado inflamatório – PMN	0	13	6	0,0305
	1	0	4	
	2	0	2	

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; LMN = linfomononuclear; CG = células gigantes; PMN = polimorfonuclear; 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada; 3 = intensa;

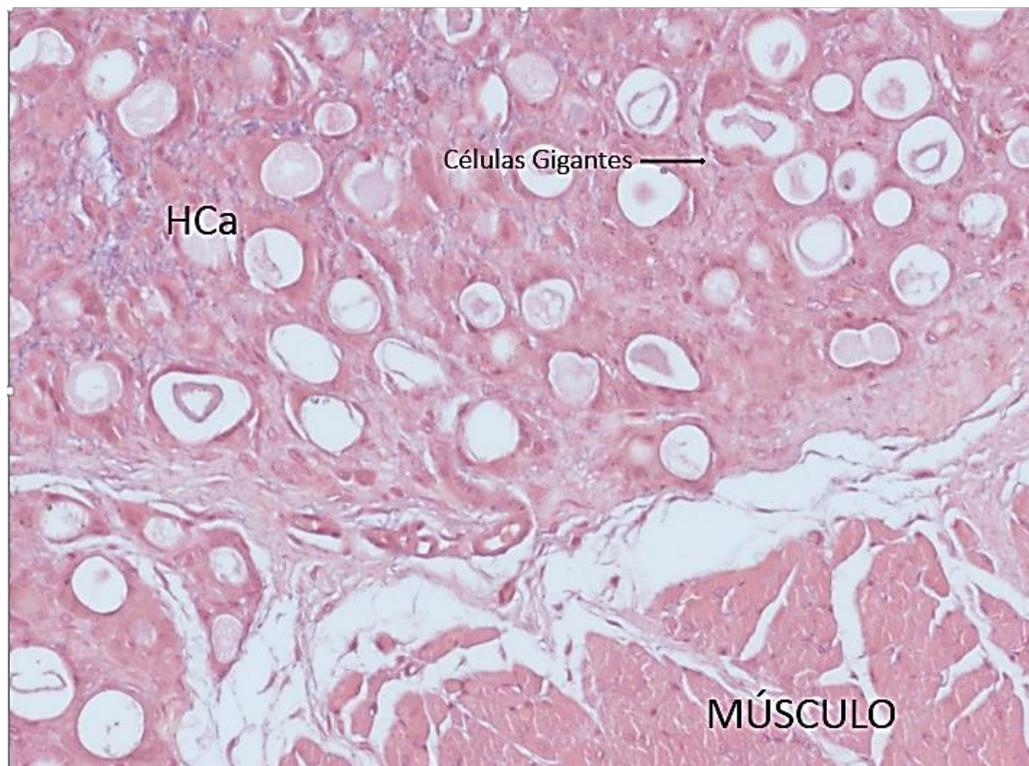
**Tabela 3** - Infiltrado inflamatório da reação ao material injetado 12 semanas após a injeção.

Variável analisada	Variável histológica	Após 12 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 9	
Infiltrado inflamatório - LMN	0	1	0	0,2402
	1	9	7	
	2	3	2	
Infiltrado inflamatório - CG	1	0	1	0,008
	2	0	4	
	3	13	4	
Infiltrado inflamatório - PMN	0	13	7	0,3458
	1	0	2	

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada; 3 = intensa; LMN = linfomononuclear; CG = células gigantes; PMN = polimorfonuclear

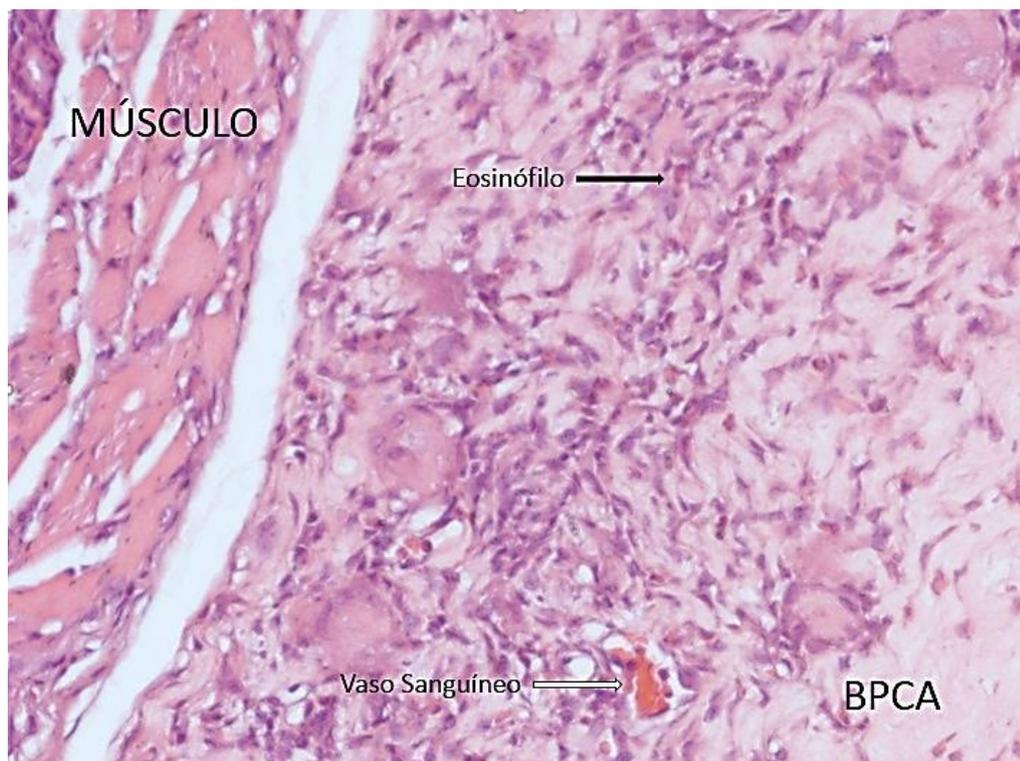
Após 3 e 12 semanas a reação induzida por células do grupo linfomononuclear foi predominantemente leve a moderada nas pregas vocais que receberam HCa. Após cada intervalo, havia um coelho que não desenvolveu qualquer reação por esse tipo celular. Já nas pregas vocais que receberam BPCA, a reação celular foi sempre leve ou moderada nos dois períodos estudados. Não houve diferença significativa entre as duas substâncias após 3 semanas ( $p=0,7768$ ) e após 12 semanas do procedimento ( $p=0,2402$ ) para esse parâmetro.

A reação inflamatória induzida por aplicação de HCa nas pregas vocais dos coelhos apresentou um componente de células gigantes, significativamente mais exuberante (Figura 4), quando comparado com a reação ao BPCA. Esse fato pode ser observado após 3 semanas ( $p=0,0211$ ) e 12 semanas ( $p=0,008$ ).



**Figura 4** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada por HCa, após 3 semanas do procedimento. Observam-se células gigantes multinucleadas (seta) envolvendo o material injetado (aumento: 400x).

Com relação ao BPCA, a reação inflamatória mostrou um componente baseado em células do tipo polimorfonucleares, mais importante quando comparado à HCa apenas 3 semanas após o procedimento ( $p=0,0305$ ). Após 12 semanas, não houve diferença no parâmetro citado ( $p=0,3458$ ). Nas duas situações, a reação inflamatória ocorreu principalmente por causa da presença de eosinófilos, e foram raros os neutrófilos presentes nas peças (Figura 5).



**Figura 5** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada por BPCA, após 3 semanas do procedimento. Observa-se o infiltrado inflamatório predominante por células do tipo PMN, especialmente eosinófilos (seta preta). Nota-se também a presença de neoformação vascular dentro do material injetado (seta branca) (aumento: 400x).

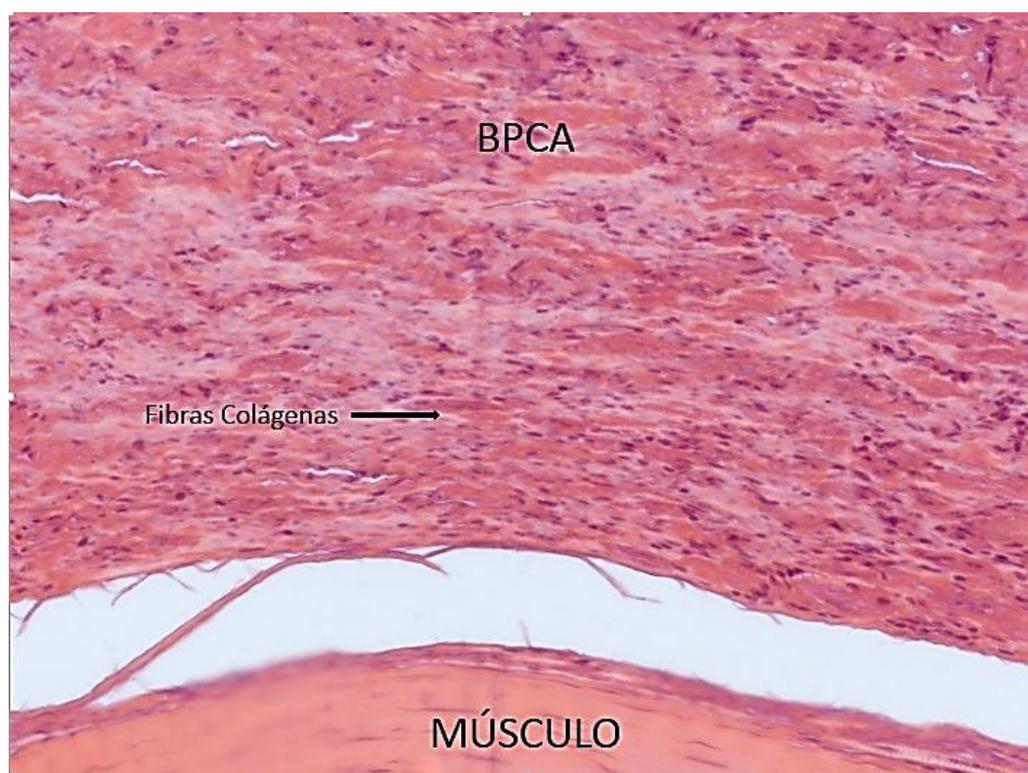
### 5.2.2 Presença de fibrose e de angiogênese

A presença de fibrose no leito da injeção foi avaliada para ambas as substâncias. Após 3 semanas, a fibrose encontrada foi leve ou ausente tanto para a HCa, como para o BPCA (Tabela 4). Não foi encontrada diferença significativa no parâmetro em questão para os materiais estudados ( $p=1$ ). Após 12 semanas da injeção, a HCa se comportou de forma semelhante ao observado após 3 semanas. Já o BPCA apresentou aumento discreto da presença de fibrose no leito cirúrgico (Figura 6). Ainda assim, a diferença entre as duas substâncias não foi estatisticamente significativa ( $p=0,7897$ ).

**Tabela 4** - Presença de fibrose e angiogênese 3 semanas após aplicação de HCa e BPCA.

Variável analisada	Variável histológica	Após 3 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 12	
Fibrose	0	9	8	1,0
	1	4	4	
	2	0	0	
Angiogênese	0	10	2	0,0083
	1	3	8	
	2	0	2	

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada



**Figura 6** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada por BPCA, após 12 semanas do procedimento. Observa-se a presença de fibrose no leito cirúrgico sob a forma de fibras colágenas (seta) (aumento: 400x).

As pregas vocais, quando foram avaliadas após 3 semanas da injeção, mostraram que o BPCA desencadeou uma formação maior de vasos sanguíneos no sítio da injeção, quando comparadas com a HCa ( $p=0,0083$ ). Apesar de uma angiogênese maior observada nas pregas vocais que receberam o BPCA após 12 semanas (Tabela 5), o valor não foi estatisticamente significativo ( $p=0,1236$ ).

**Tabela 5** - Presença de fibrose e angiogênese 12 semanas após aplicação de HCa e BPCA.

Variável analisada	Variável histológica	Após 12 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 9	
Fibrose	0	9	4	0,7897
	1	4	5	
Angiogênese	0	9	1	0,1236
	1	4	6	
	2	0	2	

HCa = hidróxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderada

### 5.2.3 Alterações na mucosa vocal

O efeito da reação inflamatória desencadeada pela injeção de HCa e do BPCA sobre a mucosa vocal foi avaliada após 3 semanas (Tabela 6) e após 12 semanas (Tabela 7). No que concerne à integridade do epitélio da prega vocal (Mucosa-Revestimento), ambas as substâncias praticamente não a alteraram. Três semanas após a injeção, apenas uma das 13 pregas vocais que receberam HCa apresentou algum grau de alteração na integridade da mucosa vocal. Tal fato ocorreu por infiltrado inflamatório que envolveu o epitélio, sem presença de erosão ou

ulceração. Não houve qualquer alteração na integridade da mucosa das pregas vocais que receberam BPCA que foram estudadas 3 semanas após a aplicação (Figura 7). Essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,3478$ ). Após 12 semanas do procedimento, nenhum dos dois materiais provocou qualquer alteração na integridade da mucosa vocal.

**Tabela 6** - Alterações na mucosa vocal 3 semanas após a aplicação de HCa e BPCA.

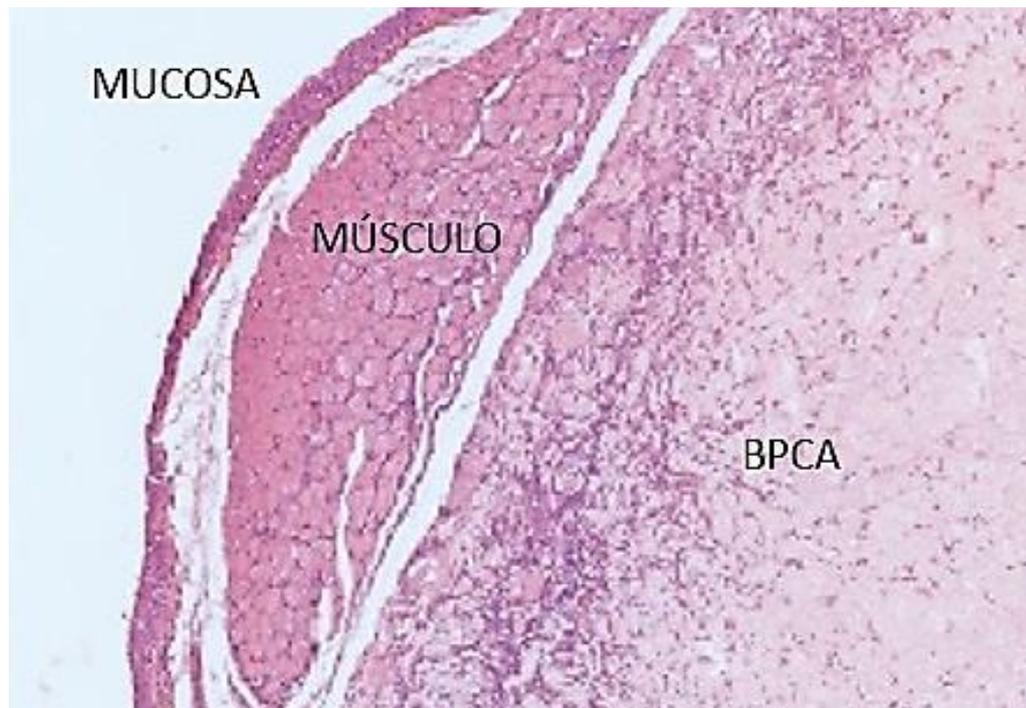
Variável analisada	Variável histológica	Após 3 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 12	
Mucosa – Revestimento	0	12	12	0,3478
	1	1	0	
Mucosa – Inflamação	0	5	4	1,0
	1	8	8	
Mucosa – Fibrose	0	12	10	0,7728
	1	1	2	

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; 0 = ausente; 1 = leve

**Tabela 7** - Alterações na mucosa vocal 12 semanas após a aplicação de HCa e BPCA.

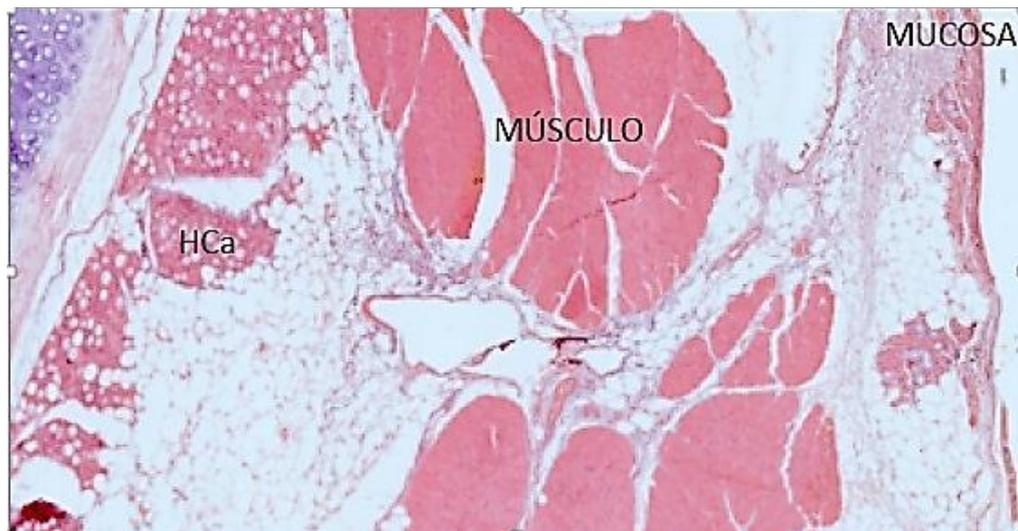
Variável analisada	Variável histológica	Após 12 semanas		Teste Wilcoxon
		HCa	BPCA	
		n = 13	n = 9	
Mucosa – Revestimento	0	13	9	
	1	0	0	
Mucosa – Inflamação	0	10	6	0,1489
	1	3	3	
Mucosa – Fibrose	0	11	8	0,7656
	1	2	1	

HCa = hidroxiapatita de cálcio; BPCA = biopolímero de cana-de-açúcar; n = quantidade de pregas vocais; 0 = ausente; 1 = leve



**Figura 7** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada com BPCA, após 3 semanas do procedimento. Observa-se uma visão panorâmica da prega vocal, com mucosa íntegra, sem infiltrado inflamatório ou fibrose subepitelial (aumento: 100x).

Quando avaliado o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subepitelial, observou-se que após 3 semanas da injeção, o infiltrado foi considerado ausente ou leve (Tabela 6) para ambos os materiais estudados, importando destacar que não houve diferença significativa entre as amostras ( $p=1$ ). Após 12 semanas da aplicação, a presença do infiltrado inflamatório na região não foi observada ou se apresentou de modo discreto tanto para a HCa (Figura 8), quanto para o BPCA. Novamente a diferença encontrada entre os materiais não foi significativa sob o ponto de vista estatístico ( $p=0,1489$ ).



**Figura 8** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada com HCa, após 12 semanas do procedimento. Observa-se uma visão panorâmica da prega vocal, com mucosa íntegra, sem infiltrado inflamatório importante ou fibrose subepitelial (aumento: 40x).

Com relação à presença de fibrose na região subepitelial da mucosa, a análise efetuada após 3 semanas da injeção de HCa ou BPCA mostrou ausência desse achado (maioria das pregas vocais estudadas) ou fibrose discreta na região (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre os dois materiais injetados nesse caso ( $p=0,7728$ ). Após 12 semanas da injeção, os resultados observados mostravam fibrose subepitelial discreta em poucos cortes histológicos para os dois materiais, e a ausência de fibrose foi o achado mais comum (Tabela 7). A diferença estatística novamente não foi significativa ( $p=0,7656$ ). Na Figura 9 se observa o epitélio de uma prega vocal na qual foi injetado o BPCA, após 12 semanas do procedimento.



**Figura 9** - Corte histológico transversal da prega vocal injetada com HCa, após 12 semanas do procedimento. Observa-se uma visão detalhada da mucosa vocal, com estruturas íntegras e normais, sem infiltrado inflamatório ou fibrose subepitelial (aumento: 400x).

## 6 DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Delineamento do estudo e metodologia

A capacidade de regular a pressão subglótica e o grau de fechamento das pregas vocais são indispensáveis para o funcionamento perfeito da laringe<sup>(9,10)</sup>. A insuficiência glótica é uma condição clínica caracterizada pela incapacidade de coaptação adequada das pregas. Essa disfunção, na fisiologia laríngea, pode ser provocada por uma série de condições clínicas e afetar pacientes com perfis bastante diferentes, o que faz com que seu tratamento deva ser individualizado<sup>(1,12,13)</sup>. Nem sempre se pode tratar o fator etiológico da insuficiência glótica e reverter completamente o quadro. Nesses casos, a abordagem com o objetivo de corrigir o distúrbio funcional do órgão é a mais indicada<sup>(7,11)</sup>.

Dentre as formas de tratamento funcional para o referido quadro clínico, destacam-se as cirurgias do arcabouço laríngeo, que foram descritas inicialmente há quase um século por Payr<sup>(14)</sup>. Após ter sido abandonada durante um período, por apresentar índice de complicações elevado, a técnica foi padronizada por Isshiki, de modo que esse tipo de cirurgia se popularizou e ganhou adeptos ao redor do mundo<sup>(15-17)</sup>. Parte do sucesso dessa abordagem ocorre por conta de seus resultados promissores e índices de complicação baixos<sup>(39)</sup>. No entanto, fatores como a técnica ser laboriosa, a curva de aprendizado longa e o aumento do risco de complicações com algumas condições clínicas comuns aos pacientes com insuficiência glótica, incitaram a busca por alternativas para esse tratamento<sup>(18,20,21)</sup>. Além disso, incisões

cervicais têm sido vistas como algo indesejável do ponto de vista estético, de tal sorte motiva-se a procura por acessos diferentes, também para outros tipos de cirurgias cervicais<sup>(19)</sup>.

Em algumas situações, as IL são uma segunda opção para o tratamento da insuficiência glótica, com resultados animadores<sup>(7,11)</sup>. O maior interesse por esse tipo de procedimento advém da possibilidade de tratamento ambulatorial, e índice de complicações baixo, mesmo na vigência de situações que contraindicariam a tireoplastia tipo 1, como as coagulopatias e quimioterapia em curso<sup>(2)</sup>.

Optou-se por estudar o tratamento de longa duração da insuficiência glótica com IL. Alguns materiais usados para esse fim caíram em desuso por conta das complicações<sup>(23,24,40)</sup> ou porque não eram muito adequados nas IL de caráter ambulatorial, como a gordura<sup>(5)</sup>. Foi escolhida como referência para essa modalidade terapêutica a injeção de HCa, com amplo respaldo na literatura médica<sup>(22,25-27,38)</sup>. No entanto, uma vez que essa literatura também mostra as complicações e inconvenientes com o uso da HCa, não se pode deixar de considerar que outros materiais possam surgir para substituir, com vantagens, essa substância<sup>(3,28)</sup>.

Ao longo das últimas décadas os polímeros sintéticos, com base em carboidratos, vêm sendo estudados para aplicação em biomedicina<sup>(29)</sup>. Dentre eles, destaca-se o BPCA, que foi desenvolvido, no ano 2000, na Universidade Federal de Pernambuco mediante síntese bacteriana a partir do melão da cana-de-açúcar<sup>(8)</sup>. Desde o seu desenvolvimento, o BPCA tem sido estudado como material para implante em diversas áreas da medicina, com resultados promissores por apresentar toxicidade baixa e capacidade adequada de integração ao tecido receptor<sup>(30-33)</sup>. Os

estudos mostraram que o biopolímero desencadeava uma reação inflamatória discreta no local implantado e, além disso, era reabsorvido gradativamente pelo organismo. Tal achado poderia sugerir o uso do BPCA como material em IL, para correção temporária da insuficiência glótica.

Outros trabalhos, no entanto, apontam algo bem interessante. Tanto no uso como substituto da dura-máter em ratos, como para preenchimento de globos oculares eviscerados de coelhos, os autores avaliaram não só a reação inflamatória ao BPCA como também a possibilidade de substituição do biopolímero por material orgânico. Em ambos os casos foi observado que à medida que o BPCA era reabsorvido, havia deposição de colágeno no local<sup>(34,35)</sup>. Tal achado sugere que o efeito de massa conseguido com a injeção de BPCA pode ser mantido, em algum grau, mesmo após a reabsorção do mesmo. Em virtude disso, o BPCA foi comparado com a HCa, e não, com um material de reabsorção mais curta, como o *gelfoam* ou o ácido hialurônico<sup>(7)</sup>.

Antes de analisar a necessidade de desenvolver um novo material para o uso nas IL, é pertinente questionar se os resultados funcionais conseguidos com as IL são ao menos comparáveis àqueles obtidos com a tireoplastia tipo 1. Quando comparados com a tireoplastia tipo 1, sem rotação de aritenóide, tanto a gordura quanto a HCa tiveram resultados funcionais semelhantes na correção da insuficiência glótica<sup>(37,38)</sup>.

O coelho foi escolhido como animal para a experimentação e, entre outros, o que motivou a escolha é o fato do animal possuir pregas vocais com estrutura histológica semelhante às pregas vocais humanas, nas quais se pode identificar epitélio, lâmina própria e músculo vocal. Soma-se a isso o fato desse animal ser dócil

e de fácil manuseio. Além disso, a literatura mostra outros trabalhos que utilizaram coelhos como modelo animal para estudo de enxertos para pregas vocais<sup>(4,36,41,42)</sup>.

A comparação entre a HCa e o BPCA no presente estudo foi feita a partir do estudo histológico da reação inflamatória desencadeada por cada material na prega vocal de coelhos. A reação inflamatória foi escolhida como parâmetro para avaliar o possível resultado funcional do BPCA por influência direta na biocompatibilidade do material e a capacidade vibratória do epitélio vocal após a injeção. Com relação à referida capacidade, o infiltrado inflamatório pode invadir a camada superficial da lâmina própria, ou a mucosa das pregas vocais. A camada superficial da lâmina própria é uma porção indispensável na formação da onda mucosa, em virtude das suas propriedades elásticas. Quaisquer eventos que levem a uma alteração nas características dessa porção da prega vocal podem impactar na qualidade vocal. Em casos mais importantes, a reação inflamatória pode atingir também o epitélio vocal. O simples espessamento desse epitélio ou, nos casos mais graves, a ulceração ou formação de granulomas, pode ter um impacto negativo muito importante na qualidade vocal após uma IL. Em outros estudos<sup>(4,26,36,41,42)</sup> foi utilizada a reação inflamatória ao material aplicado cirurgicamente dentro da prega vocal, como fator preditivo para os resultados funcionais do material em questão. A presença de uma reação inflamatória excessiva ao material escolhido para a IL era ligada a complicações, insucessos nesse procedimento e má qualidade vocal com vários materiais, incluindo a HCa<sup>(3,24)</sup>.

Para o presente estudo, foram escolhidos oito parâmetros relacionados com a reação inflamatória desencadeada pela injeção de cada material. O objetivo era avaliar e comparar a reação gerada pela HCa e pelo BPCA em dois momentos

diferentes: 3 e 12 semanas após a injeção. Dos oito parâmetros escolhidos, três permitiram avaliar a intensidade e a predominância celular da inflamação no local do material injetado, a saber: por células linfomononucleares, polimorfonucleares, ou células gigantes. Foram avaliados também a presença e o grau de fibrose, e angiogênese na peça. Por causa da importância da integridade histológica e funcional da camada superficial da lâmina própria e da mucosa vocal, foram escolhidos três parâmetros para avaliar o possível efeito da reação inflamatória nessas estruturas, quais sejam: a integridade do epitélio, o infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subepitelial (córion) e a presença de fibras colágenas na porção subepitelial da mucosa.

O presente estudo foi feito com amostras pareadas, a fim de reduzir o efeito da variação da reação inflamatória entre os animais da experimentação. Não houve qualquer diferença no grau de dificuldade técnica entre fazer a aplicação em uma prega vocal ou na prega vocal contralateral. Além disso, não houve diferença no grau de dificuldade do procedimento com a HCa e com o BPCA, o que exclui a chance de um material ter sido injetado de maneira mais precisa.

Uma vez que tanto a HCa é utilizada na prática clínica por meio de injeção, quanto o BPCA é estudado para a mesma finalidade, optou-se por uma técnica de aplicação desses materiais o mais próximo possível do que é aplicado na prática para as IL. A técnica de aplicação via transoral de materiais na prega vocal de coelhos usando espéculo nasal, já foi utilizada em outras investigações<sup>(36,42)</sup>.

Escolheu-se avaliar a resposta inflamatória após 3 semanas da injeção, para contemplar a reação inflamatória precoce, com início da remodelação do tecido<sup>(43)</sup>. Já

a escolha de 12 semanas foi proposta porque a remodelação da matriz extracelular, com deposição de fibras colágenas e a redução na quantidade de água no local, já podem ser observadas no estudo histológico<sup>(44)</sup>.

## **6.2 Presença do material injetado nas pregas vocais dos coelhos**

Quando avaliada a presença de HCa dentro da prega vocal dos coelhos, após 3 e 12 semanas, observou-se que não houve redução na quantidade de pregas vocais com o material. Este fato é compatível com os dados da literatura, que apontam que a HCa tem um tempo de permanência superior a um ano dentro da prega vocal<sup>(7)</sup>.

Após a aplicação do BPCA, foi observada uma redução na quantidade de pregas vocais que apresentavam o polímero após 12 semanas de injeção, quando comparadas às pregas vocais 3 semanas após o mesmo procedimento. Esse achado pode ser explicado pela absorção gradual do BPCA ao longo do tempo, como mostram outros trabalhos<sup>(34,35)</sup>. Mais um ponto que reforça essa hipótese é o fato de que algumas das pregas vocais que não apresentavam o polímero após 12 semanas, mostravam reação histológica compatível com a presença desse material dentro da prega vocal, por exemplo teor aumentado de polimorfonucleares e de fibras colágenas. Tais pregas vocais, no entanto, não foram utilizadas na análise estatística. Não foram encontrados granulomas ou outros achados sugestivos de extrusão do material, tampouco foram observados sinais de deslocamento do material para locais adjacentes durante a preparação das peças.

Cumprе salientar que no presente estudo não se avaliou o tempo médio de absorção do material injetado. Há ainda a possibilidade de que a confecção de BPCA em gel, com concentrações diferentes da que foi utilizada (hidrogel a 1%), pode variar com o tempo médio de permanência dentro da prega vocal.

### **6.3 Estudo histológico dos materiais**

#### **6.3.1 Predominância celular**

Ao ser avaliada a reação inflamatória desencadeada por cada substância, foi possível observar semelhanças entre elas, assim como suas particularidades. Como citado por Rosen et al.<sup>(22)</sup>, uma das características de um bom material para IL é ele ser biologicamente inerte. Tal assertiva indica que, quanto melhor o material para o procedimento, menor a reação inflamatória desencadeia. Partindo desse pressuposto, foi comparada a reação inflamatória suscitada por cada material, em seu sítio cirúrgico, quanto a intensidade e a predominância celular.

Quando observada a predominância e a intensidade do infiltrado inflamatório por células do grupo linfomononuclear, constatou-se que ambos os materiais provocaram uma reação inflamatória, no máximo, moderada no sítio cirúrgico. Tanto após 3 semanas ( $p=0,7768$ ), quanto após 12 semanas ( $p=0,2402$ ), não se observou diferença entre os materiais. Segundo esse parâmetro, os dois materiais se equivalem.

A análise histológica da reação inflamatória por células gigantes mostrou que a HCa desencadeava uma reação inflamatória mediada por esse tipo de células, muito

mais importante do que o BPCA, o que se mostrou verdadeiro tanto para 3 semanas ( $p=0,0211$ ), quanto para 12 semanas ( $p=0,008$ ). O infiltrado por células gigantes é usualmente visto nas reações do tipo corpo-estranho e na formação de granulomas<sup>(43)</sup>. O achado de uma reação inflamatória importante baseada em células gigantes pode explicar, ao menos em parte, as complicações inflamatórias descritas por DeFatta et al.<sup>(3)</sup> após IL com a HCa em seres humanos, dentre as quais destacam-se a reação tipo corpo-estranho e a formação de granulomas.

A reação inflamatória mediada por células do grupo polimorfonuclear apresentou comportamentos distintos após 3 e 12 semanas da injeção. Quando estudada a resposta precoce à aplicação de cada material, foi observada uma reação mais importante para o BPCA do que para a HCa, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0305$ ). No entanto, quando avaliada a reação após 12 semanas, os resultados mostraram que o BPCA gerou uma reação discreta com células do grupo polimorfonuclear e, mesmo sendo superior àquela gerada pela HCa, não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais. Os achados sugerem que a resposta fundamentada nesse tipo de célula diminui com o tempo, diferente do que foi observado com a resposta de células gigantes à HCa.

Vale ressaltar que os achados relativos à resposta inflamatória ao BPCA na presente pesquisa corroboram os de outros estudos, nos quais também foi usado o biopolímero na mesma apresentação de hidrogel a 1%<sup>(35,36)</sup>.

### 6.3.2 Presença de fibrose e neoformação vascular

A análise de dados sobre presença de fibras colágenas no local do implante não mostrou diferença expressiva entre as substâncias. A fibrose não foi observada ou era discreta tanto para a HCa quanto para o BPCA. Após 3 semanas da injeção, a presença de fibras colágenas foi praticamente idêntica para ambas as substâncias ( $p=1,000$ ). Após 12 semanas, esse achado foi maior para o BPCA, ainda que a diferença entre as duas substâncias não tenha sido significativa ( $p=0,7897$ ). Quando se avalia materiais para restaurar o espaço de Reinke, a formação de tecido fibroso e fibras colágenas no local pode ter efeito deletério para os resultados funcionais da injeção, porque existe a possibilidade dessa resposta tissular alterar a vibração da mucosa vocal. Porém, se a proposta do procedimento for a restauração da competência glótica e a manutenção do seu efeito por longo tempo, a formação de fibras colágenas no sítio da injeção de material pode ser algo desejável, desde que a injeção não seja realizada diretamente na lâmina própria, como realizado no presente trabalho.

A presença de fibras colágenas no local do implante reforça a ideia de manutenção de algum grau de medialização, mesmo após a absorção completa do material. Em tese de doutoramento, Lima<sup>(34)</sup> mostrou que, ao ser usado como substituto de dura-máter, à medida que era reabsorvido, o BPCA era substituído por fibras colágenas. Isso possibilitou que a meninge pudesse manter sua integridade, mesmo após a absorção do polímero.

Em um experimento no qual foi usado o BPCA para preencher o globo ocular eviscerado em coelhos, Cordeiro et al.<sup>(35)</sup> mostraram que após 3 meses do

procedimento, o grau de redução volumétrica dos bulbos que receberam o BPCA foi de 8%. Vale ressaltar, que o processo de absorção do BPCA e a substituição do mesmo por colágeno ainda não tinham alcançado o centro do implante. Isso sugere que seja necessária, no momento da injeção, uma correção volumétrica um pouco acima do que se deseja no resultado final. A referida prática, no entanto, já é comum para a maioria dos materiais utilizados nas IL, mesmo para aqueles indicados para tratar a insuficiência glótica por período prolongado como a HCa e a gordura<sup>(2)</sup>.

Não se deve esperar que a possibilidade de correção da insuficiência glótica seja garantida exclusivamente pelo efeito de massa do material injetado na prega vocal. Em um trabalho no qual foi avaliado o efeito da injeção de materiais temporários de correção de insuficiência glótica, Yung et al.<sup>(45)</sup> observaram que os pacientes submetidos à IL com materiais absorvíveis, eram menos propensos a necessitarem procedimentos definitivos, mesmo quando não havia recuperação da mobilidade da prega vocal injetada, quando comparados aos pacientes que eram apenas submetidos à fonoterapia. Os autores teorizaram que o deslocamento do processo vocal pela IL poderia conferir algum grau de medialização da prega vocal paralisada, o que se manteria após meses. Friedman et al.<sup>(46)</sup> também observaram o efeito positivo da injeção até o sexto mês, de materiais temporários, o que reduziria a necessidade de um procedimento definitivo com uma incisão cervical no paciente. O que foi exposto mostra que o efeito de massa não é o único a conferir à IL com BPCA a possibilidade de correção, em longo prazo, da insuficiência glótica.

No que concerne à avaliação da angiogênese, os resultados também divergiram entre os materiais. Na avaliação realizada após 3 semanas da injeção, observou-se uma formação neovascular no sítio de implantação do BPCA, mais

importante do que o que foi observado com a aplicação da HCa ( $p=0,0083$ ). Este achado foi novamente mais importante para o BPCA após 12 semanas da injeção; no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,1236$ ). A presença de neoformação vascular foi encontrada na maioria das pregas vocais nas quais foi injetado o BPCA, em ambos os períodos estudados (Tabelas 4 e 5). Para o polímero, esse achado foi classificado como leve ou moderado, e o grau leve foi o mais encontrado em ambos os períodos. A presença de neoformação vascular é importante para a biointegração de materiais injetáveis e indispensável para a migração de células que serão responsáveis pela organização da matriz extracelular e a deposição de fibras colágenas no local, como citam Tonnesen et al.<sup>(47)</sup>.

### **6.3.3 Alterações na mucosa**

O epitélio vocal e a camada mais superficial da lâmina própria desempenham uma função muito importante na propagação da onda mucosa na prega vocal<sup>(9)</sup>. Sempre que se estuda a aplicação cirúrgica de quaisquer substâncias no interior das pregas vocais, é pertinente avaliar se isso terá algum impacto nestas camadas. A presença de infiltrado inflamatório intenso que envolvia a porção vibrante da prega vocal foi responsável por resultados funcionais pobres obtidos por algumas substâncias usadas em IL, geralmente por causa da rigidez da mucosa e, em casos mais graves, alteração da integridade da mucosa vocal com formação de úlceras e granuloma<sup>(3,24)</sup>.

Os parâmetros escolhidos para avaliar a integridade anatômica e funcional do epitélio vocal foram: a integridade do epitélio, o infiltrado inflamatório no tecido

conjuntivo subepitelial e a presença de fibras colágenas na porção subepitelial da mucosa. As alterações causadas pela injeção de um ou outro material estudado sobre os três parâmetros que permitiram avaliar a integridade da mucosa vocal eram ausentes ou leves, tanto após 3 semanas, quanto após 12 semanas. A única exceção foi um caso de infiltrado inflamatório moderado 12 semanas após a injeção do BPCA. Uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa nos achados referentes às alterações de mucosa, tanto após 3 semanas quanto após 12 semanas, pode-se concluir que, com relação aos parâmetros citados, nas pregas vocais de coelhos as substâncias se equivalem.

#### **6.4 Evolução dos parâmetros histológicos**

Foi avaliada, em caráter complementar, a evolução das alterações histológicas geradas pela injeção de cada substância entre 3 e 12 semanas. Com relação à HCa, todos os parâmetros estudados permaneceram praticamente estáveis, à exceção da intensidade do infiltrado inflamatório subepitelial, que pareceu se reduzir entre a terceira e a décima segunda semana, cujo resultado, no entanto, não foi estatisticamente significativo.

Com relação ao BPCA, observou-se que a resposta inflamatória mediada por células do grupo linfomononuclear e do grupo polimorfonuclear foi menos intensa, quando comparados os resultados após 3 e 12 semanas. Resultado semelhante foi encontrado para o infiltrado inflamatório subepitelial, que também diminuiu entre as duas observações. Já a presença de fibrose no local da injeção aumentou entre a

terceira e a décima segunda semana. Esses resultados indicaram que a reação inflamatória ao BPCA tende a diminuir com o passar do tempo, bem como que a concentração de fibras colágenas no leito cirúrgico aumenta à medida que o BPCA é absorvido. As diferenças, novamente, não foram estatisticamente significativas.

Os resultados sugestivos, porém não conclusivos, podem ter sido causados por dois fatores principais: ou uma quantidade reduzida de amostras ou um tempo curto de seguimento após a injeção dos materiais. Cumpre ressaltar, no entanto, que o aumento da quantidade de coelhos utilizados no estudo, assim como alteração do tempo de seguimento para seis meses poderia tornar o estudo muito longo, uma vez que a quantidade de coelhos que poderiam ser mantidos simultaneamente no biotério da UFPE é limitado. Outro aspecto a ser considerado é que este é um estudo exploratório, conforme citado anteriormente.

## **6.5 Perspectivas**

Esse estudo é pioneiro ao comparar a HCa e o BPCA para o tratamento de insuficiência glótica usando um modelo experimental.

O BPCA apresenta, como visto, uma reação inflamatória discreta, com a possibilidade de um efeito de massa de longa duração pela substituição do polímero por tecido autólogo (fibras colágenas). Cumpre ressaltar, que o estudo foi feito com uma única concentração da substância (hidrogel a 1%). Não se deve descartar a possibilidade de que concentrações de BPCA distintas da que foi utilizada possam apresentar resultados diferentes. É possível que preparações diferentes do BPCA

levem a resultados, por exemplo, mais duradouros, como já descrito com o ácido hialurônico<sup>(48)</sup>.

Novos estudos que avaliem de forma objetiva o ganho de massa da prega vocal e sua duração, assim como a resposta a preparações diferentes do BPCA, permitiriam avaliar melhor a possibilidade de uso do polímero para o tratamento da insuficiência glótica. Tais dados são importantes para consolidar a possibilidade de estudos sobre o uso do BPCA para o tratamento da insuficiência glótica em seres humanos.

## 7 CONCLUSÕES

## 7 CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que:

- a injeção de BPCA na prega vocal de coelhos apresentou reação inflamatória discreta, sendo mais intensa que a HCa quanto ao infiltrado por polimorfonucleares apenas após 3 semanas da injeção;
- a neoformação vascular foi mais importante no BPCA, apenas após 3 semanas da injeção, quando comparada com a HCa; e,
- a reação mediada por células gigantes foi mais importante na HCa, tanto após 3 semanas quanto após 12 semanas da injeção. Em todas as pregas vocais nas quais a HCa foi injetada, a reação foi intensa, independente se a prega vocal foi estudada após 3 ou 12 semanas do procedimento.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Giraldez-Rodriguez LA, Johns M. Glottal insufficiency with aspiration risk in dysphagia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2013 Dec;46(6):1113–21.
2. Rosen C, Mallur P. Office-Based Laryngeal Injections. *Otolaryngol Clin North Am.* 2013;46:85–100.
3. DeFatta RA, Chowdhury FR, Sataloff RT. Complications of injection laryngoplasty using calcium hydroxylapatite. *J Voice.* 2012;26(5):614-8.
4. Hachiya A, Imamura R, Parra ER, Sennes LU, Tsuji DH. Histologic study of perifascial areolar tissue implanted in rabbit vocal folds : An experimental study. *Ann Otol Rhino Laryng.* 2010;119(10):707-5.
5. Carneiro CDG, Hiroshi D, Sennes LU, Ximenes JA. Uso da gordura e fáscia muscular autólogas no tratamento da insuficiência glótica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(1):140-4.
6. Reijonen P, Tervonen H, Harinen K, Rihkanen H, Aaltonen L-M. Long-term results of autologous fascia in unilateral vocal fold paralysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266(8):1273-8.
7. King JM, Simpson CB. Modern injection augmentation for glottic insufficiency. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;15(3):153-8.
8. Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *Carbohydr Polym.* 2000;42(4):375-83.
9. Sataloff RT, Heman-Ackah YD, Hawkshaw MJ. Clinical anatomy and physiology of the voice. *Otolaryngol Clin North Am.* 2007;40(5):909-29.
10. Logemann J. Trato digestivo superior. In: Bailey B, Johnson J, editors. *Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.* Quarta Edi. Revinter; 2009. p. 3-10.

---

<sup>1</sup> Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

11. Misono S, Merati AL. Evidence-based practice: evaluation and management of unilateral vocal fold paralysis. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012;45(5):1083-108.
12. Sewall GK, Jiang J, Ford CN. Clinical Evaluation of Parkinson's-Related Dysphonia. *Laryngoscope.* 2006;116:1740-4.
13. Kendall K. Presbyphonia: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;15(3):137-40.
14. Payr E. Plastik am Schildknorpel zur Behebung der Folgen einseitiger Stimmbandla.pdf. *Dtsch Med Wochenschr.* 1915;43:1265-70.
15. Daniero JJ, Garrett CG, Francis DO. Framework Surgery for Treatment of Unilateral Vocal Fold Paralysis. *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 2014;2(2):119-30.
16. Isshiki N. Deslocamento Medial da Prega Vocal. In: Isshiki N, Tsuji D, Sennes L, editors. *Tireoplastias. Fundação de Otorrinolaringologia;* 1999. p. 79-94.
17. Isshiki N, Morita H, Okamura H HM. Thyroplasty as a new phonosurgical technique.pdf. *Acta Otolaryngol.* 1974;78:451-7.
18. Young VN, Zullo TG, Rosen CA. Analysis of laryngeal framework surgery: 10-year follow-up to a national survey. *Laryngoscope.* 2010;120(8):1602-8.
19. Duncan TD, Rashid Q, Speights F, Ejeh I. Endoscopic transaxillary approach to the thyroid gland: our early experience. *Surg Endosc.* 2007;21(12):2166-71.
20. Tibbs MK. Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiother Oncol.* 1997;42(2):99-106.
21. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
22. Rosen CA, Gartner-Schmidt J, Casiano R, Anderson TD, Johnson F, Reussner L, et al. Vocal fold augmentation with calcium hydroxylapatite (CaHA). *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;136(2):198-204.
23. Rivera-Serrano CM, Smith LJ. Laryngeal teflon granuloma: endoscopy, laryngeal videostroboscopy, and CT imaging. *Ear Nose Throat J.* 2011;90(3):E25-6.
24. Tate JR, Belafsky PC, Vandewalker K. Teflon granuloma. *Ear Nose Throat J.* 2007;86(3):134-6.
25. Rosen CA, Thekdi AA. Vocal fold augmentation with injectable calcium hydroxylapatite: short-term results. *J Voice.* 2004;18(3):387-91.

26. Belafsky PC, Postma GN. Vocal fold augmentation with calcium hydroxylapatite. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;131(4):351-4.
27. Woo S, Son Y, Lee S, Park J. On the efficiency of the injection laryngoplasty technique using calcium hydroxyapatite (CaHA): The thyrohyoid approach versus the cricothyroid approach. *J Voice.* 2012;27:236-41.
28. Kimura M, Mau T, Chan R. Viscoelastic properties of phonosurgical biomaterials at phonatory frequencies. *Laryngoscope [Internet].* 2010 [cited 2013 Jul 23];120(4):764-8.
29. Varma A, Kennedy J, Galgali P. Synthetic polymers functionalized by carbohydrates: a review. *Carbohydr Polym.* 2004;56(4):429-45.
30. Coelho MCOC, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FA, Mota RA, Tenório Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras.* 2002;17(supl 1):11-3.
31. Lucena G. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal: análise estereológica. [tese]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco. 2007. 109 pág.
32. Lima F, Lima JRQ, Hirakawa P, Medeiros-Junior D, Lima F, Aguiar J. Resposta inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno re-implantadas no peritônio parietal de ratos. *An Fac Med Univ Fed Pernambuco.* 2005;50(1):37-40.
33. Barros SD, Aguiar JLA, Marques E, Barros Coelho AR., Rolim Filho EL. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fásia autóloga em Chinchilla laniger. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2006;51(1):45-51.
34. Lima F. Membrana de Biopolímero de Cana-de-Açúcar Como Substituto de Dura-Máter em Ratos Wistar [Tese]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. 2008.
35. Cordeiro-Barbosa FDA, Aguiar JLDA, Lira MMDM, de Pontes Filho NT, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arq Bras Oftalmol.* 2012;75(4):267-72.
36. Leão RAS, Assis RC, Caldas Neto SS, Lira MMM, Vasconcelos SJ. Otorhinolaryngology effect of sugarcane biopolymer gel injected in rabbit vocal fold. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014;80(3):220-5.
37. Umeno H, Chitose S-I, Sato K, Ueda Y, Nakashima T. Long-term postoperative vocal function after thyroplasty type I and fat injection laryngoplasty. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2012;121(3):185-91.

38. Shen T, Damrose EJ, Morzaria S. A meta-analysis of voice outcome comparing calcium hydroxylapatite injection laryngoplasty to silicone thyroplasty. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;148(2):197-208.
39. Van Ardenne N, Vanderwegen J, Van Nuffelen G, De Bodt M, Van de Heyning P. Medialization thyroplasty: vocal outcome of silicone and titanium implant. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(1):101-7.
40. Selber J, Sataloff R, Spiegel J, Heman-Ackah Y. Gore-Tex medialization Thyroplasty: Objective and subjective evaluation. *J Voice.* 2003;17(1):88-95.
41. Lancelotti C, Donati F. Estudo preliminar do comportamento histológico da prega vocal do coelho após injeção de ácido hialurônico. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2007;73(2):171-8.
42. Hong SJ, Lee SH. Head and neck surgery plasma gel as a new augmentation arterial for injection laryngoplasty in rabbit model: histologic analysis. *Otolaryngol Neck Surg.* 2013;149(4):596-602.
43. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2009;20(2):86-100.
44. Thibeault SL, Gray SD, Bless DM, Chan RW, Ford CN. Histologic and rheologic characterization of vocal fold scarring. *J Voice.* 2002;16(1):96-104.
45. Yung KC, Likhterov I, Courey MS. Effect of temporary vocal fold injection medialization on the rate of permanent medialization laryngoplasty in unilateral vocal fold paralysis patients. *Laryngoscope.* 2011;121(10):2191-4.
46. Friedman AD, Burns JA, Heaton JT, Zeitels SM. Early versus late injection medialization for unilateral vocal cord paralysis. *Laryngoscope.* 2010;120(10):2042-7.
47. Tonnesen MG, Feng X, Clark RAF. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2000;5:40-6.
48. Lau DP, Lee GA, Wong SM, Lim VP, Chan YH, Tan NG, Rammage LA, Morrison MD. Injection laryngoplasty with hyaluronic acid for unilateral vocal cord paralysis. Randomized controlled trial comparing two different particle sizes. *J Voice.* 2010;24(1):113-8.

## APÊNDICES

## APÊNDICE 1

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 01) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 09 de abril de 2010.

Ofício nº 252/10

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof. Silvio da Silva Caldas Neto.**  
Departamento de Cirurgia - CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.027413/2009-08

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado: **"EFEITO DA INJEÇÃO DO BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇUCAR NA PREGA VOCAL DE COELHOS. Estudo Comparativo com a hidroxiapatita"**

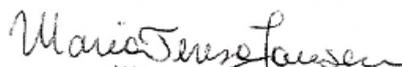
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

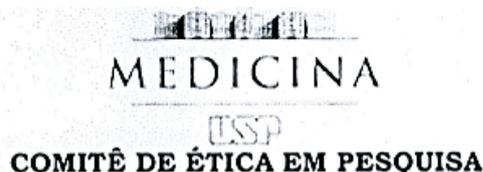
Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Observação:  
Origem dos animais: Associação pernambucana de criadores de coelhos. Animal: Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*); Raça: Califórnia; Sexo: Machos; Idade: 2 a 3 meses; Número de animais previsto no protocolo: 30 ( trinta animais) animais.

Atenciosamente,

  
 Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA

## APÊNDICE 2



O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16.06.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 122/10 intitulado: "**Efeito da injeção do biopolímero da cana-de-açúcar na prega vocal de coelhos**" e seus anexos, apresentado pelo Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

**Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji**

**Pesquisador (a) Executante: Silvio José de Vasconcelos**

**CEP-FMUSP, 16 de junho de 2010.**

  
**Prof. Dr. Eduardo Massad  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa**